

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-069967  
(43)Date of publication of application : 07.03.2000

(51)Int.Cl. // C12N 15/09  
C12N 1/20  
C12N 1/21  
C12N 9/02  
(C12N 15/09  
C12R 1:38 )  
C12R 1:01 )  
(C12N 1/20 )  
C12R 1:38 )  
(C12N 1/20 )  
C12R 1:01 )  
(C12N 1/21 )  
C12R 1:19 )  
(C12N 9/02 )  
C12R 1:19 )

(21) Application number : 10-297665

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE & TECHNOLOGY CORP

(22) Date of filing : 27.08.1998

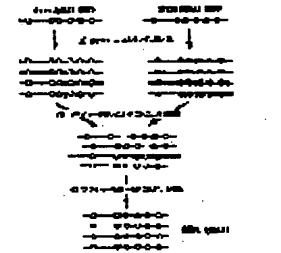
(72)Inventor : FURUKAWA KENSUKE  
KUMAMARU TETSUYA

(54) GENE ENCODING ENZYME DECOMPOSING PCB AND ITS RELATED COMPOUND

**(57)Abstract:**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a chimeric gene capable of efficiently decomposing many kinds of PCB compound and useful e.g. for environmental purification by encoding the terminal dioxygenase large subunit of biphenyl dioxygenase decomposing PCB and the like.

**SOLUTION:** This chimeric gene is obtained by recombining a gene encoding the terminal dioxygenase large subunit derived from different kinds of PCB-decomposing bacteria, such as *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF strain and *Burkholderia cepacia* L400 strain through DNA shuffling and encodes the terminal dioxygenase large subunit of biphenyl dioxygenase decomposing PCB and its related compounds. This chimeric gene encodes an amino acid sequence of formula I and consists of a base sequence of formula II.



**Ba Eta Sia Aja Jia Arg Ha Zeta Der Sia sii Imp. 100. Job Bet Bet  
400 400 400**

estimaciones de precios de bienes y servicios en el sector público y privado. 1990

**SECRETARÍA TECNOLÓGICA DEL ESTADO DE SANTO DOMINGO EXCELENTE 1000  
INSTITUTO FEDERAL DE FORMACIÓN PROFESIONAL ESTADUAL IFPE**

## **LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

08.04.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

- [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
- [Date of final disposal for application]
- [Patent number]
- [Date of registration]
- [Number of appeal against examiner's decision of rejection]
- [Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
- [Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-69967

(P2000-69967A)

(43)公開日 平成12年3月7日(2000.3.7)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup> C 12 N 15/09 // C 12 N 1/20 1/21 9/02	識別記号 ZNA ZAB	F I C 12 N 15/00 1/20 1/21 9/02	テマコード*(参考) ZNA A F ZAB D
---	--------------------	---	-----------------------------------

審査請求 未請求 請求項の数 6 FD (全 12 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-297665

(22)出願日 平成10年8月27日(1998.8.27)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年3月5日  
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌 第  
72巻臨時増刊号」に発表

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72)発明者 古川 謙介

福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 九州大  
学 農学部農芸化学科内

(72)発明者 熊丸 哲也

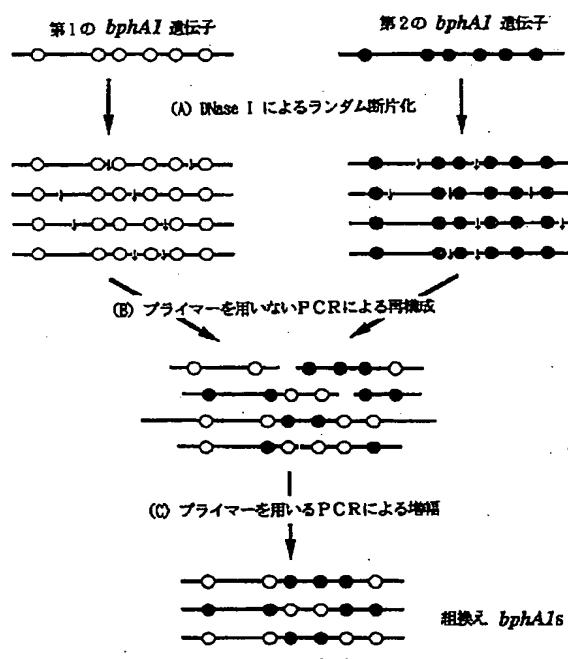
福岡県福岡市東区箱崎6-10-1 九州大  
学 農学部農芸化学科内

(74)代理人 100087675

弁理士 筒井 知

(54)【発明の名称】 PCBおよび関連化合物を分解する酵素をコードする遺伝子

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 可及的多種類のPCB(ポリ塩化ビフェニ  
ル)化合物の分解に寄与し得るPCB分解遺伝子の取得  
によるPCBの効率的な分解技術の提供。【解決手段】 異種のPCB分解菌由来のビフェニルジ  
オキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニット  
をコードする遺伝子をDNAシャフリングにより組換え  
ることによって得られ、広範なPCB及び関連化合物  
(ベンゼン、トルエン、ジフェニルメタン、ジベンゾフ  
ラン等)を分解するビフェニルジオキシゲナーゼの  
末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードしている  
キメラ遺伝子。キメラ遺伝子を得るために異種のPCB  
分解菌の好ましい例は、シュードモナス・シュードアル  
カリゲネスKF707株及びバーコルデリア・セパシア  
LB400株である。

1

2

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 異種のP C B分解菌由来のビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードする遺伝子をDNAシャフリングにより組み換えることによって得られ、P C Bおよび関連化合物を分解するビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードしていることを特徴とするキメラ遺伝子。

【請求項2】 异種のP C B分解菌が、シュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株およびバーコルデリア・セパシアLB400株である請求項1の遺伝子。

【請求項3】 配列番号1のアミノ酸配列をコードしている請求項2の遺伝子。

【請求項4】 配列番号2の塩基配列から成る請求項3の遺伝子。

【請求項5】 配列番号3のアミノ酸配列をコードしている請求項2の遺伝子。

【請求項6】 配列番号4の塩基配列から成る請求項5の遺伝子。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、環境汚染物質であるP C Bおよびその関連化合物の効率的な分解を触媒する酵素タンパク質をコードする新規な遺伝子に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 P C B(ポリ塩化ビフェニル)は、絶縁剤、熱媒体、塗料、感圧紙などに広く使用されていたが、その有害性が指摘されて以来、生産は中止されている。しかしながら、過去に大量に生産された一部のP C Bは、未処理のままで廃棄されて土壤や地下水を汚染したり、ゴミ燃焼によりダイオキシンを発生して大気汚染をもたらし深刻な社会問題となっている。

【0003】 P C Bはビフェニルに塩素ガスを直接吹きつけて製造され、塩素の付加する数(1~10)と置換位置の違いにより理論上、209種類の化合物ができるが、いずれも、化学的にきわめて安定があるので、これを処理して無害化することは非常に困難である。P C Bの無害化処理には、高温で完全に焼却したり、硫黄を加えて加熱し樹脂状の化合物にする等の方法が提示されているが、これらの方法は、自然環境に放出されたP C Bの処理には適用できない。自然環境中に薄く広がったP C Bの処理は自然界に存在する微生物による分解にまたねばならない。微生物は古来より環境に存在する多種多様の物質を分解資化する機能を獲得してきたので、これを利用するのである。

【0004】 P C Bの分解については、ビフェニルを炭素源として生育する土壤細菌が広く存在し、これらがP C Bを部分的に酸化分解(コメタボリズム)することが明らかにされて以来、世界中で多くのP C B分解菌が分

10

20

30

40

50

離されている。これまで分離されたP C B分解菌はグラム陰性細菌が多いが、最近、グラム陽性細菌も分離されている。前者の例はPseudomonas、Burkholderia、Acinetobacter、Achromobacterなどであり後者はRhodococcusである。これらのP C B分解菌について、その分解機能が検討され、さらに、幾つかの菌株からP C B分解遺伝子(P C B分解を触媒する酵素をコードする遺伝子)も単離され塩基配列が決定されている。

【0005】 土壤細菌によるP C Bの分解は、塩化安息香酸への酸化分解であり、この分解には4つの酵素が関与することが明らかにされている(古川ら、Biodegradation5: 289-300 (1994))。すなわち、酵素分子のビフェニル環への導入はビフェニルジオキシゲナーゼ(BPDox)により触媒され、生じたジヒドロジオール化合物はデヒドログナーゼによりジオール(フェニルカテコール)へ変換される。次いで、環開裂ジオキシゲナーゼによりメタ開裂黄色化合物へと変換され、ヒドロラーゼにより塩化安息香酸へと分解される。

【0006】 しかしながら、これまで分離されたP C B分解菌は、それぞれ、多種類存在するP C B化合物のうち専ら特定の化合物を分解するにすぎない。例えば、代表的なP C B分解菌株であるシュードモナス・シュードアルカリゲネス(Pseudomonaspseudoalcaligenes)KF707株とバーコルデリア・セパシア(Burkholderiacepacia)LB400株とを比較すると、KF707株は5位に塩素置換したP C Bなどの塩素数1~3の低塩化P C Bを良く分解し、一方、LB400株は2、5位に塩素置換したP C Bなどの塩素数4~5の高塩化P C Bを分解する。P C Bの効率的な分解には、多種類のP C B化合物を同時に分解できるようなP C B分解遺伝子の存在が望まれるが、そのような遺伝子は未だ見出されていない。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、可及的に多種類のP C B化合物の分解に寄与し得るようなP C B分解遺伝子を取得して、P C Bの効率的な分解を行うことのできる技術を確立することにある。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上述の目的を達成するために研究を重ねた結果、各種のP C B分解菌由来のビフェニルジオキシゲナーゼの大サブユニット(末端ジオキシゲナーゼの大サブユニット)の遺伝子間でランダムな組換えを行うことにより、親株よりも広範なP C B分解特性を示し、しかも、その他の化合物(以下、関連化合物という)も併せて分解することのできるP C B分解遺伝子を得ることを見出し本発明を完成した。

【0009】 すなわち、本発明は、異種のP C B分解菌由来のビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼ大サブユニットをコードする遺伝子をDNAシャフ

リングにより組み換えることによって得られ、P C B および関連化合物を分解するビフェニルジオキシゲナーゼの末端ジオキシゲナーゼサブユニットをコードしていることを特徴とするキメラ遺伝子を提供する。

【0010】本発明のキメラ遺伝子を得るための異種のP C B 分解菌の好ましい例は、ショードモナス・ショードアルカリゲネスKF 707株およびバーコルデリア・セパシアLB 400株であり、これから得られるキメラ遺伝子の好ましい具体例は、配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子または配列番号2から成る遺伝子、および配列番号3のアミノ酸配列をコードする遺伝子または配列番号4から成る遺伝子である。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】本発明が対象とするビフェニルジオキシゲナーゼ(BP Dox)は、多成分酵素であり、酵素を活性化し、基質に添加する末端ジオキシゲナーゼ(B p h A 1/B p h A 2)とNADHからの電子の伝達に関与するフェレドキシン(B p h A 3)とフェレドキシン還元酵素(B p h A 4)から構成される。末端ジオキシゲナーゼは鉄・硫黄を含むタンパク質であり、大サブユニット(B p h A 1)と小サブユニット(B p h A 2)の二つのサブユニットがA 1<sub>3</sub> A 2<sub>3</sub>のヘテロヘキサマーとして会合している(古川ら、Biodegradation 5 : 289-300 (1994))。

【0012】そして、各種のP C B 分解菌株を比較すると、それらの間にはB p h A 1における少数のアミノ酸に違いが存在するが、残りの構成成分は実質的に同一であることが明らかにされている(F. Mondello他、Appl. Environ. Microbiol., 63 : 3039-3103 (1997))。例えば、上述のショードモナス・ショードアルカリゲネスKF 707株とバーコルデリア・セパシアLB 400株とでは、B p h A 1を構成する459個のアミノ酸のうちの20個のアミノ酸が相違するが、B p h A 2は僅か1個のアミノ酸が違うのみで、B p h A 3およびB p h A 4は同一である(古川ら、J. Bacteriol. 179 : 3936-3943 (1997))。

【0013】本発明者は、これら的事実に注目し、複数のP C B 分解菌由来のB p h A 1をコードする遺伝子(b p h A 1)の間でランダムな組換えを行い親株のP C B 分解菌と可及的に異なる配列のb p h A 1遺伝子が得られるようにすることにより、これまでに見出されたP C B 分解菌に見られない広範なP C B の分解、さらにはその関連化合物の分解を触媒する酵素(キメラ酵素)をコードするキメラb p h A 1遺伝子を調製する手法を確立した。なお、本明細書において用いる「関連化合物」という語は、一般に、ベンゼン、トルエン、フェノールのような単一のベンゼン環から成る芳香族化合物、およびビフェニル化合物(例えば、4-メチルビフェニル)、ジフェニル化合物(例えば、ジフェニルメタン、ジフェニルエタン)またはジベンゾ化合物(例え

ば、ジベンゾフラン)のような2個のベンゼン環から成る芳香族化合物を指称する。さらに、本発明に従えば、トリクロルエチレンのような低級脂肪族化合物の分解を触媒する酵素をコードするb p h A 1遺伝子を得ることも可能である。

【0014】本発明に従い、複数の異なるP C B 分解菌由来のB p h A 1遺伝子間でランダムな組換えを生じさせキメラb p h A 1遺伝子を得るには、DNAシャーフリングと呼ばれる手法を用いる。DNAシャーフリングとは、Stemmerによって案出されたDNAの組換え法であり(W.P.C. Stemmer, Nature 370 : 389-391 (1994); W.P.C. Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 10747-10751 (1994))、組換えを行おうとする複数種の遺伝子を混ぜ合わせてランダムに断片化し、得られた小断片DNAに対しプライマーを入れない自己プライミングPCR(self-primer PCR)(PCR:ポリメラーゼ連鎖反応)を行わせて再構成したDNAを増幅することによりキメラDNAを調製するものである。

【0015】このようなDNAシャーフリング法を用いて本発明のキメラb p h A 1遺伝子を構築する工程を図1に沿って説明すると次のようになる。

(1) 異種のP C B 分解菌から得られた第1のb p h A 1遺伝子と第2のb p h A 1遺伝子とを混合し、DNAse Iのようなエンドヌクレアーゼでランダムに断片化して、10~50 bpのDNAを回収する(図1の(A))。

【0016】(2) 上記の工程で得られた小断片DNAにプライマーを用いないでPCRを行う。これによって、小断片DNA自身がお互いにプライマーとして働き、第1のb p h A 1遺伝子と第2のb p h A 1遺伝子が組み換えられて再構成された新たなb p h A 1キメラDNA群が得られる(図1の(B))。このPCR反応において用いるDNAポリメラーゼとしては、従来から一般的に使用されているTaq DNAポリメラーゼよりは、PfuやPwoのようなproofreading機能(ミスマッチした塩基の結合を校正する機能)を有するDNAポリメラーゼが好ましく、これによって、活性なビフェニルジオキシゲナーゼを発現するクローンを得る頻度が高くなる。

【0017】(3) 次いで、得られたキメラB p h A 1遺伝子を、b p h A 1のオリゴマーから成るプライマーを用いるPCRに供して増幅し、1.4 kbの組換えキメラb p h A 1群を得る(図1の(C))。

【0018】(4) 以上のようなDNAシャーフリング法によって得られた組換えb p h A 1遺伝子をb p h A 2 A 3 A 4 B C(BP DoxにおいてB p h A 1に後続する酵素成分をコードする遺伝子)を有するプラスミドベクターの上流に連結し(図2参照)、これを大腸菌に形質転換し、ビフェニルから黄色化合物を生成するクローンを選択する。

【0019】(5) 選択したクローニングの組換え $bphA_1$ 遺伝子を上記(4)と同様に $bphA_2 A_3 A_4 B C$ を有するプラスミドベクターの上流に連結し、これを大腸菌に導入、発現させ、その発現産物（通常は、大腸菌の静止菌体中に発現された酵素）について各種PCBおよび関連化合物の分解能を試験する。

【0020】本発明に従えば、以上のようにDNAシャーフリングを利用して異種のPCB分解菌由来のビフェニルジオキシゲナーゼ(BP Dox)の大サブユニット(末端ジオキシゲナーゼの大サブユニット： $BphA_1$ )をコードする遺伝子( $bphA_1$ )をランダムに組み換えることにより、PCBおよび関連化合物を分解するBP Doxの $BphA_1$ をコードするキメラ $bphA_1$ 遺伝子を得ることができる。本発明は、これまで分離されているようないずれのタイプのPCB分解菌にも適用できるが、PCB分解特性が互いに本質的に異なる異種のPCB分解菌、例えば、前述したような専ら低塩化PCBを分解するシュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株タイプのPCB分解菌と高塩化PCBを分解するバーコルデリア・セパシアLB400株タイプのPCB分解菌を使用するのが好ましい。

【0021】本発明が適用される異種のPCB分解菌の組合せ特に好ましい例は、シュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株とバーコルデリア・セパシアLB400株である。シュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株は、北九州で分離され、FERM P-8297として寄託されている(古川ら、J.Bacteriol. 166: 392-398 (1986)参照)。また、バーコルデリア・セパシアLB400株は、米国ニューヨーク州で分離され、米国のアグリカルチュラル・リサーチ・センター(the Agricultural Research Center)に寄託番号NRR LB 18064として寄託され同センターから入手できる(D. L. Bedard他、Appl. Environ. Microbiol. 51: 761-768 (1986); L. H. Bopp, J. Ind. Microbiol., 1: 23-29 (1986) 参照)。

【0022】本発明に従いシュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株とバーコルデリア・セパシアLB400株を用いて得られ、PCBおよび関連化合物を分解するBP Doxのキメラ $bphA_1$ 遺伝子の好ましい具体例は、配列番号1のアミノ酸配列をコードする遺伝子、または配列番号2から成る遺伝子である。この遺伝子は、低塩化PCBおよび高塩化PCBのいずれも優れた分解能を有するとともに、ジベンゾフランやジフェニルメタンのような化合物に対しても分解能を有するBP Doxのキメラ $bphA_1$ 遺伝子であることが確かめられている。

【0023】本発明に従いシュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株およびバーコルデリア・セパシアLB400株から得られるキメラ $bphA_1$ 遺伝子の別の好ましい具体例は、配列番号3のアミノ酸配列を

コードする遺伝子または配列番号4から成る遺伝子である。この遺伝子は、低塩化PCBおよび高塩化PCBのいずれにも優れた分解能を有するとともに、ジベンゾフランやジフェニルメタンのような化合物、さらには、ベンゼンやトルエンのような単環芳香族化合物に対しても分解能を有するBP Doxのキメラ $bphA_1$ 遺伝子であることが確認されている。

【0024】以下、本発明をさらに説明するため、シュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株(以下、単にKF707株という)とバーコルデリア・セパシアLB400株(以下、単にLB400株という)を用いて本発明のキメラ遺伝子を調製する場合の実施例を示すが、本発明の原理は他のPCB分解菌を用いる場合にも同様に適用され得るものである。

#### 【0025】

【実施例】DNAse Iによるランダム断片化：KF707株由来の $bphA_1$ とLB400株由来の $bphA_1$ の1:1 DNA混合物(全量2 $\mu$ g)を蒸留水で90 $\mu$ lに稀釀し、これに10倍濃度バッファー液(1Mのトリス-HCl、pH7.5+10mMのMnCl<sub>2</sub>)10 $\mu$ lを添加した。得られた反応物(最終容量100 $\mu$ l)を15℃で6分間、DNAse I(0.15U/10 $\mu$ l;宝酒造製)を用いて分解(断片化)した後、80℃で10分間加熱することにより分解反応を停止させた。分解反応後のDNAを2%の低融点アガロースゲル(宝酒造製)上で電気泳動させ、Whatman社(英國Maldstone在)製DE81イオン交換紙を用いて10~50bpのDNA断片を回収した。1MのNaClを用いて溶出後、該DNAをフェノール/クロロホルム混合液(1:1)で抽出し、さらに冷エタノールで沈殿させた。

【0026】プライマーを用いないPCRによる再構成：上記のようにして断片化されたDNA(100~200ng)を10 $\mu$ lのPCRプレミックス[5倍濃度Pfuバッファー液、各dNTP濃度0.4mM、0.1U/ $\mu$ lのPfuポリメラーゼ(米国カリフォルニア州La JollaのStratagene社製)]に添加してPCRを行った。PCRの各工程の条件は次のとおりであり、45サイクル実施した：2本鎖DNAの変性、94℃で1分間；プライマーアニーリング、52℃で1.5分間；プライマー伸長、72℃で1分間。

【0027】プライマーを用いるPCRによる増幅：上記のようなプライマーを用いないPCRにより得られた生成物に対して、 $bphA_1$ 遺伝子のプライマーを用いて再度PCRを実施した。用いたプライマーは、5'-CCGAATTCAAGGAGACGTTGAATCATGAGCTCAGC-3'(配列番号5)および5'-TTGAATTCTTCCGGTTGACAGATCT-3'(配列番号6)である。

【0028】上記のプライマーを用いないPCR生成物

の100倍稀釀液の $1\mu l$ を鋤型として25サイクルのPCRを行った。PCRの条件(最終容量 $50\mu l$ )は次のようにした:各プライマーの量 $50\text{pmol}$ 、等倍濃度Taqバッファー液、 $2.2\text{mM}$ のMgCl<sub>2</sub>、各dNTPの濃度 $0.2\text{mM}$ 、Taq/Pfu(1:1)混合物の量 $1.25\text{U}$ 。PCRの各工程の条件は、上記のプライマーを用いないPCRの場合と同じにした。但し、最終サイクルの伸長工程は10分間とした。0.7%のアガロースゲルを用いる電気泳動法により、 $1.4\text{kb}$ の増幅bphA1遺伝子が得られたことを確認した。

#### 【0029】bphA1遺伝子のクローニング

上記のようにして得られたPCR生成物をSacIおよびBglIIで酵素分解し、アガロースゲル電気泳動法により精製し、プラスミドベクターpJHF18ΔM1uIのSacI/BglII切断部位に連結した。得られた組換えプラスミドを大腸菌エシェリヒア・コリXL1-BLue(米国stratagene社製)に形質転換し、 $50\mu g/ml$ のアンピシリンおよび $0.1\text{mM}$ のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを含有するLB寒天上にまいた。ビフェニル蒸気から環開裂黄色化合物を生成するコロニーを陽性クローンとして選択した。

【0030】なお、プラスミドベクターpJHF18ΔM1uIは、アンピシリン耐性遺伝子を含みKF707株由来のbphA1A2A3A4BC遺伝子を有するプラスミドpJHF18(古川ら、Gene 138: 27-33)をM1uIにより酵素分解しT4-DNAポリメラーゼでエンドフィリングすることによりbphA1遺伝子の部分を分解除去した(ΔbphA1)プラスミドであり、上記のようにDNAシャフリングで得られた組換えキメラbphA1遺伝子をSacIおよびBglIIの両方で酵素分解して該プラスミドと反応させると、該キメラbphA1遺伝子はΔbphA1の部分に入りbphA2の上流に連結させることができる(図2参照)。

#### 【0031】PCBおよび関連化合物の分解能試験

以上のようにして選択した陽性クローンのキメラbphA1遺伝子を上記と同様にプラスミドベクターpJHF18ΔM1uIのbphA2の上流に連結し、これを大腸菌エシェリヒア・コリJM109株(米国stratagene社製)に導入、発現させた。すなわち、該形質転換大腸菌を対数増殖期( $600\text{nm}$ における濁度 $0.8\sim1.2$ )まで培養した後、 $50\text{mM}$ のリン酸カリウムバッファー液(pH7.5)で2回洗浄し、さらに同じバッファー液 $20\text{ml}$ 中に懸濁させて $600\text{nm}$ における濁度 $1.0$ となるように調整した。

【0032】このようにして調製した大腸菌の静止菌体に、エタノールに溶かしたPCBおよび関連化合物を濃度 $20\mu g/ml$ となるように添加した。1~6時間、 $200\text{rpm}$ で遠心分離して得た $2\text{ml}$ の上清について、以下の波長における吸光度を測定することにより、各種のビフェニル化合物由来のメタ開裂黄色化合物の生

成量を調べた:ビフェニル $434\text{nm}$ ;4-メチルビフェニル $437\text{nm}$ ;ジフェニルメタン $395\text{nm}$ ;ジベンゾフラン(DF) $465\text{nm}$ ;2,2'-ジクロロビフェニル(2,2'-CB) $393\text{nm}$ ;2,5,4'-トリクロロビフェニル(2,5,4'-CB) $412\text{nm}$ ;4-クロロビフェニル(4CIBP) $438\text{nm}$ 。

【0033】なお、KF707株およびLB400株についても、同様に、大腸菌JM109株を用いる発現実験を行い、PCBおよび関連化合物の分解能試験を行った。その結果、クローニングにより選択された6種の陽性クローンのキメラbphA1遺伝子を含むプラスミドで形質転換された組換え大腸菌のうち2種は、特に優れたPCBおよび関連化合物に対する分解能を示した。

【0034】すなわち、組換え大腸菌のうち1種は、ビフェニルに対しては、KF707株の1.8倍、LB400株の2.3倍、4-クロロビフェニルに対してはKF707株の1.2倍、LB400株の1.5倍、4,4'-ジクロロビフェニルに対してKF707株の1.8倍(LB400株はこの化合物に対する活性を有しない)の分解活性を示した。また、2,5,4'-トリクロロビフェニルに対しては、LB400株と同様に2,5-ジクロルリングの3,4一位に酸素分子を導入(KF707株は4'-リングの2,3一位に導入)することができ、その活性は2.1倍であり、2,5,2',5'-テトラクロロビフェニルに対しては2,5-ジクロルリングの3,4一位にLB400株の0.8倍(KF707株はこの化合物に対する活性を有しない)の活性で酸素を導入し得ることも分かった。さらに、ジフェニルメタンに対してはKF707株の1.2倍(LB400株はこの化合物に活性なし)、ジベンゾフランに対してはLB400株の0.5倍(KF707株はこの化合物に活性なし)の活性を有していた。

【0035】このように、上記化合物の全てに対して高い分解活性を有する新規なビフェニルジオキシゲナーゼを発現するキメラbphA1遺伝子が得られたことが示された。得られた該キメラbphA1遺伝子をDNAシークエンサー(アプライドバイオシステム社製373A)により分析し、配列番号1のアミノ酸配列および配列番号2の塩基配列を有することを確認した。

【0036】また、組換え大腸菌の別の1種は、ビフェニルに対しては、KF707株の1.2倍、LB400株の1.5倍、4-クロロビフェニルに対しては、KF707株の1.2倍、LB400株の1.5倍、4,4'-ジクロロビフェニルに対しては、KF707株の1.8倍(LB400株はこの化合物に活性なし)の分解活性を示した。そして、2,5,4'-トリクロロビフェニルに対してはKF707株と同様、4'-クロルリングの2,3'一位で酸素分子を導入(LB400株は2,5-リングの3,4一位に導入)することができ、その活性は

9

10

1.5倍であることが示された。また、ジフェニルメタンに対してはKF707株の1.2倍(LB400株はこの化合物に活性なし)、ジベンゾフランに対しては、LB400株の0.3倍(KF707株はこの化合物に活性なし)の分解活性を有していた。

【0037】すなわち、この大腸菌の静止菌体中に発現されたBP Doxは上記化合物の全てに対して高い分解活性を有することが示された。さらに、この組換え大腸菌は、KF707株およびLB400株由来の酵素が全く分解できないベンゼン、トルエンに対しても分解活性を示し、インドールからインジゴを産生することが認められた。このキメラbphA1遺伝子をDNAシーケンサーで分析することにより配列番号3のアミノ酸配列および配列番号4の塩基配列を有することを確認した。

【0038】これらのP C B高分解性酵素コードするキ

## SEQUENCE LISTING

Asp Val Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro  
                  180                 185                 190  
 Tyr Met Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile  
                  195                 200                 205  
 Gly Gly Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala  
                  210                 215                 220  
 Glu Gln Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu  
                  225                 230                 235                 240  
 Ser Gly Ile Leu Ala Gly Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser Gln Ala  
                  245                 250                 255  
 Gln Ile Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Ala Trp Gly Gly His  
                  260                 265                 270  
 Gly Ser Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met  
                  275                 280                 285  
 Gly Pro Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Asp Leu  
                  290                 295                 300  
 Ala Glu Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly  
                  305                 310                 315                 320  
 Gln His Met Ser Val Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn  
                  325                 330                 335  
 Thr Ile Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp  
                  340                 345                 350  
 Ala Phe Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu  
                  355                 360                 365  
 Tyr Arg Arg His Asn Ile Arg Asn Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu  
                  370                 375                 380  
 Gln Asp Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly  
                  385                 390                 395                 400  
 Tyr Lys Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg  
                  405                 410                 415  
 Ser Gln Thr Gly His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly Tyr Val Tyr  
                  420                 425                 430  
 Ala Glu Glu Ala Ala Arg Gly Met Tyr His His Trp Met Arg Met Met  
                  435                 440                 445  
 Ser Glu Pro Ser Trp Ala Thr Leu Lys Pro  
                  450                 455  
 <210> 2  
 <211> 1377  
 <212> DNA  
 <213> *Pseudomonas pseudoalcaligenes*  
                  Burkholderia cepacia  
 <400> 2  
 atgagctcat caaatcaaaga agtgcaggga gcccctgtga agtgggttac caattggacg 60  
 ccggaggcga tccgggggtt ggtcgatcg gaaaaaggc tgcttgatcc acgcatactac 120  
 gccgatcaga gtctttatga gctggagctt gagcgggttt ttggtcgcctc ttggctgtta 180  
 cttggcacg agagtcatgt gcctgaaacc ggggacttcc tggccactta catggcga 240  
 gatccgtgg ttatggtgcg acagaaagac aagagcatca aggtgttcc gaaccagtgc 300  
 cgccacccgcg gcatgcgtat ctggcgctcg gacgccccga acgccaaggc tttcacctgc 360  
 agctatcagc gctgggccta cgacatcgcc ggcaagctgg tgaacgtgcc gttcgagaag 420  
 gaaggctttt gcgacaagaa agaaggcgcac tgccggcttt acaaggccga atggggcccg 480

13

14

ctccaggcac gcgtggcaac ctacaaggc cttgcgtttt ccaactggga tggcaggcg 540  
 ccagacctgg agacctacct cggtgacgcc cgcccata tggacgtcat gctggatcg 600  
 acgccccggc ggactgtggc catcgccgc atgcagaagt gggtgattcc gtgcactgg 660  
 aagtttgcggc ccgagcaggc ctgcgtgac atgtaccacg cccggcaccat gtcgcacctg 720  
 tccggcatcc tggcggcat gccgcggaa atggacctct cccaggcgcata acccacc 780  
 aaggccaatc agttccggc cgttgggc gggcacggct cgggctgggt cgtgcacgag 840  
 ccgggcattc tcatggcggt gatggggccc aaggtcaccc agtactggac cgaaggcc 900  
 gctgcccacc tggcagaaca gcgactggc cacaccatgc cggttcgacg catgttcggc 960  
 cagcacatga gcgttccccc gacctgctcg ttcccccgg ccatcaaacac catccggacc 1020  
 tggcacccgc gcggcccaa cgaatcgaa gtgtggccct tcacccgtt cgatgcccatt 1080  
 gccccggc agatcaagga agaatatcgc cggcacaaca tccgaaactt ctccgcaggc 1140  
 ggcgtgtttt agcaggacga tggcgagaac tgggtggaga tccagaagg gctacgtgg 1200  
 tacaaggcca agagccagcc gctaattgc cagatggcc tgggtcggt gcagaccgg 1260  
 caccctgatt ttccctggcaa cgtcgctac gtctacgccc aagaagccgc gcggggatg 1320  
 tatcaccact ggtgcgcata gatgtccgag cccagctggg ccacgctcaa gcccctga 1377  
 <210> 3  
 <211> 458  
 <212> PRT  
 <213> *Pseudomonas pseudoalcaligenes*  
*Burkholderia cepacia*  
 <400> 3  
 Met Ser Ser Ser Ile Lys Glu Val Gln Gly Ala Pro Val Lys Trp Val  
                       5                         10                         15  
 Thr Asn Trp Thr Pro Glu Ala Ile Arg Gly Leu Val Asp Gln Glu Lys  
                       20                         25                         30  
 Gly Leu Leu Asp Pro Arg Ile Tyr Ala Asp Gln Ser Leu Tyr Glu Leu  
                       35                         40                         45  
 Glu Leu Glu Arg Val Phe Gly Arg Ser Trp Leu Leu Gly His Glu  
                       50                         55                         60  
 Ser His Val Pro Glu Thr Gly Asp Phe Leu Ala Thr Tyr Met Gly Glu  
                       65                         70                         75                         80  
 Asp Pro Val Val Met Val Arg Gln Lys Asp Lys Ser Ile Lys Val Phe  
                       85                         90                         95  
 Leu Asn Gln Cys Arg His Arg Gly Met Arg Ile Cys Arg Ser Asp Ala  
                       100                         105                         110  
 Gly Asn Ala Lys Ala Phe Thr Cys Ser Tyr His Gly Trp Ala Tyr Asp  
                       115                         120                         125  
 Ile Ala Gly Lys Leu Val Asn Val Pro Phe Glu Lys Glu Ala Phe Cys  
                       130                         135                         140  
 Asp Lys Lys Glu Gly Asp Cys Gly Phe Asp Lys Ala Glu Trp Gly Pro  
                       145                         150                         155                         160  
 Leu Gln Ala Arg Val Ala Thr Tyr Lys Gly Leu Val Phe Ala Asn Trp  
                       165                         170                         175  
 Asp Val Gln Ala Pro Asp Leu Glu Thr Tyr Leu Gly Asp Ala Arg Pro  
                       180                         185                         190  
 Tyr Met Asp Val Met Leu Asp Arg Thr Pro Ala Gly Thr Val Ala Ile  
                       195                         200                         205  
 Gly Gly Met Gln Lys Trp Val Ile Pro Cys Asn Trp Lys Phe Ala Ala  
                       210                         215                         220  
 Glu Gln Phe Cys Ser Asp Met Tyr His Ala Gly Thr Met Ser His Leu

15

16

225	230	235	240
Ser Gly Ile Leu Ala Ala Met Pro Pro Glu Met Asp Leu Ser Gln Ala			
245	250	255	
Gln Ile Pro Thr Lys Gly Asn Gln Phe Arg Ala Gly Trp Gly Gly His			
260	265	270	
Gly Ser Gly Trp Phe Val Asp Glu Pro Gly Met Leu Met Ala Val Met			
275	280	285	
Gly Pro Lys Val Thr Gln Tyr Trp Thr Glu Gly Pro Ala Ala Glu Leu			
290	295	300	
Ala Glu Gln Arg Leu Gly His Thr Met Pro Val Arg Arg Met Phe Gly			
305	310	315	320
Gln His Met Ser Val Phe Pro Thr Cys Ser Phe Leu Pro Ala Ile Asn			
325	330	335	
Thr Ile Arg Thr Trp His Pro Arg Gly Pro Asn Glu Ile Glu Val Trp			
340	345	350	
Ala Phe Thr Leu Val Asp Ala Asp Ala Pro Ala Glu Ile Lys Glu Glu			
355	360	365	
Tyr Arg Arg His Asn Ile Arg Thr Phe Ser Ala Gly Gly Val Phe Glu			
370	375	380	
Gln Asp Asp Gly Glu Asn Trp Val Glu Ile Gln Lys Gly Leu Arg Gly			
385	390	395	400
Tyr Lys Ala Lys Ser Gln Pro Leu Asn Ala Gln Met Gly Leu Gly Arg			
405	410	415	
Ser Gln Thr Gly His Pro Asp Phe Pro Gly Asn Val Gly Tyr Val Tyr			
420	425	430	
Ala Glu Glu Ala Ala Arg Gly Met Tyr His His Trp Met Arg Met Met			
435	440	445	
Ser Glu Pro Ser Trp Ala Thr Leu Lys Pro			
450	455		
<210> 4			
<211> 1377			
<212> DNA			
<213> Pseudomonas pseudoalcaligenes			
Burkholderia cepacia			
<400> 4			
atgagctcat caatcaaaga agtgcaggga gcccctgtga agtgggttac caattggacg 60			
ccggaggcga tccgggggtt ggtcgatcg gaaaaaggc tgcttgatcc acgcatctac 120			
gccgatcaga gtctttatga gctggagctt gagcgggttt ttggctgcgc ttggctgtta 180			
cttgggcacg agagtcatgt gcctgaaacc ggggacttcc tggccactta catggcgaa 240			
gatccggtgtt ttatggtgcg acagaaaagac aagagcatca aggtgttcc gaaccagtgc 300			
cggcacccgc gcatgcgtat ctggccgtcg gacgcccggca acgccaaggc tttcacctgc 360			
agctatcacg gctgggccta cgacatcgcc ggcaagctgg tgaacgtgcc ttgcgagaag 420			
gaaggctttt gcgacaagaa agaaggcgc tgccggctt acaaggccga atggggcccg 480			
ctccaggcac gcgtggcaac ctacaaggcc ctggctttg ccaactggga tgtgcaggcg 540			
ccagacctgg agacctacct cggtgacgcc cgccccata tggacgtcat gctggatcgc 600			
acgcccggcc ggactgtggc catcgccggc atgcagaagt gggtgattcc gtgcactgg 660			
aagtttgcgc ccgagcagtt ctgcagtgc atgttaccacg cggcacccat gtcgcaccc 720			
tccggcatcc tggcgccat gccgcccggaa atggacctct cccaggcgc aataccacc 780			
aaggcaacc agttccgggc cggctggggc gggcacggct cgggctgggt cgtcgacgag 840			
ccggcatgc tcatggcggt gatggcccc aaggtcaccc agtactggac cgagggtccg 900			

```

gctgccgagc ttgcggaca gcgactggc cacaccatgc cggttcgacg catgttcggc 960
cagcacatga gcgttccc gacctgctcg ttcccccgg ccatcaacac catccggacc 1020
tggcacccgc gggccccaa cgaatcgaa gtgtggcct tcacccgtt cgatgccat 1080
gcccggcg agatcaagga agaatatcgc cggcacaaca tccgcacctt ctccgcaggc 1140
ggcgtttt agcaggacga tggcgagaac tgggtggaga tccagaaggg gctacgtgg 1200
tacaaggcca agagccagcc gctcaatgcc cagatggcc tgggtcggtc gcagaccgtt 1260
caccctgatt ttccctggcaa cgtcggtac gtctacgccc aagaagcggc gcggggatg 1320
tatcaccact ggatgcgcat gatgtccgag cccagctggg ccacgctcaa gccctga 1377
<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Pseudomonas pseudoalcaligenes
<400> 5
ccgaattcaa ggagacgttg aatcatgagc tcagc 35
<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Pseudomonas pseudoalcaligenes
<400> 6
ttgaattctt ccgggttggaca gatct 25

```

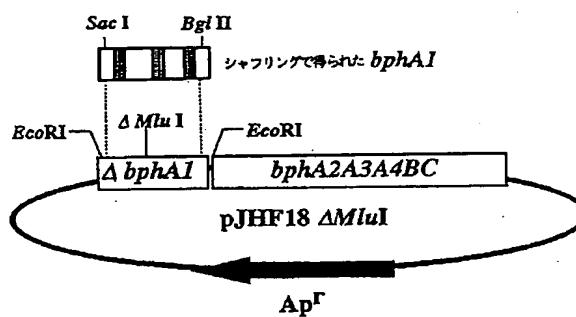
## 【図面の簡単な説明】

【図1】 DNAシャーフリング法により本発明のキメラbphA1遺伝子を調製する工程を概示する。

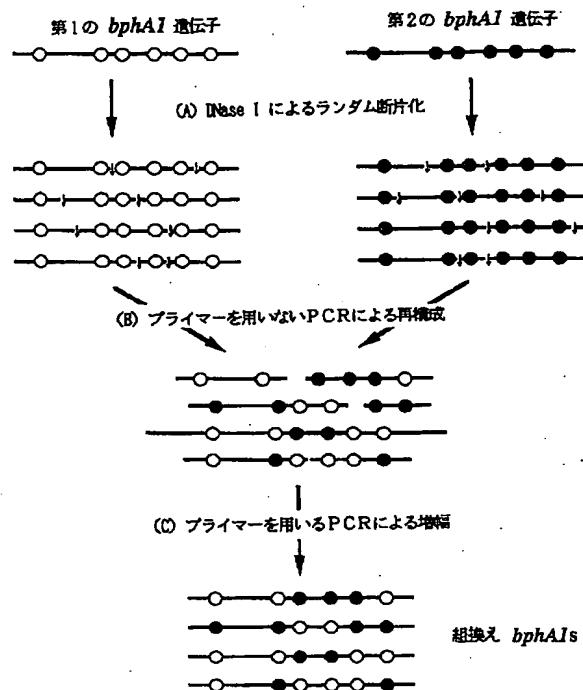
【図2】 キメラbphA1遺伝子および親株のbphA1遺伝子のクローニングおよび発現に用いるのに好適なプラスミドベクターの構成図である。

【図3】 本発明のキメラbphA1遺伝子のアミノ酸配列を親株であるシュードモナス・シュードアルカリゲネスKF707株、バーコルデリア・セパシアLB400株、およびDNAシャーフリングで得られたその他のキメラbphA1の遺伝子のアミノ酸と比較して示すものである。

【図2】



【図1】



【図3】

A	S	M S M H V	G F	M M D	-	F S V	A I T T	T	
B	A	TT T	Q I	A Y	S L E	G V I I	T F N I	N	
C	S	M S M Q I	G F	M M E	-	F S V	A I T T	T	
D	S	M S M Q I	A F	M M D	-	F S V	A I T T	N	
E	S	TT T	Q I	A Y	S L E	-	F S V	A I T T	N
F	S	M S M H V	A F	M M D	G V S V	A I T T	T	N	
G	S	TT M	Q I	A Y	S L D	-	F S V	A I T T	N
H	S	M S M Q I	A Y	S L D	-	V I I	T F N I	N	

フロントページの続き

(51) Int.C1. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
(C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:38			
1:01)			
(C 1 2 N 1/20			
C 1 2 R 1:38)			
(C 1 2 N 1/20			
C 1 2 R 1:01)			

(C 1 2 N 1/21  
C 1 2 R 1:19)  
(C 1 2 N 9/02  
C 1 2 R 1:19)